

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
(Direktor: Prof. Dr. E. Scharrer)  
Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. R. v. Fellenberg

---

KOMPLEMENTBESTIMMUNG IM SERUM

CHRONISCH LUNGENKRANKER PFERDE

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von  
CYNTHIA MARGRET LERCH-LEEMANN  
Tierärztin  
von Murgenthal und Meilen

genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. R. v. Fellenberg, Referent  
PD Dr. H. Lutz, Korreferent

Zürich 1988

Rieker + Partner AG, Glattbrugg



Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
(Direktor: Prof. Dr. E. Scharrer)  
Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. R. v. Fellenberg

---

KOMPLEMENTBESTIMMUNG IM SERUM

CHRONISCH LUNGENKRANKER PFERDE

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von  
CYNTHIA MARGRET LERCH-LEEMANN  
Tierärztin  
von Murgenthal und Meilen

genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. R. v. Fellenberg, Referent  
PD Dr. H. Lutz, Korreferent

Zürich 1988

Rieker + Partner AG, Glattbrugg



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41507222\\_0026](https://archive.org/details/IA41507222_0026)

## INHALTSVERZEICHNIS

Seite

|        |                                                                |    |
|--------|----------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | EINLEITUNG                                                     | 5  |
| 1.1.   | COPD beim Pferd                                                | 5  |
|        | a) klinisches Bild                                             | 6  |
|        | b) pathologisch-anatomische Veränderungen                      | 7  |
|        | c) pathophysiologische Mechanismen                             | 7  |
|        | d) Aetiologie                                                  | 7  |
| 1.2.   | Das Komplementsystem                                           | 9  |
| 1.3.   | Immunkomplexkrankheiten                                        | 14 |
| 1.4.   | Problemstellung                                                | 22 |
| 2.     | MATERIAL und METHODEN                                          | 23 |
| 2.1.   | Material                                                       | 23 |
| 2.1.1. | Seren                                                          | 23 |
| 2.1.2. | Erythrozyten                                                   | 25 |
| 2.1.3. | Antikörper gegen Meerschweinchenerythrozyten                   | 26 |
| 2.1.4. | Puffer                                                         | 26 |
| 2.1.5. | Spezielle Reagenzien und Materialien                           | 27 |
| 2.2.   | Methoden                                                       | 28 |
| 2.2.1. | Hämolytischer Komplement Assay                                 | 28 |
| 2.2.2. | Vorversuche zur Verbesserung der Empfindlichkeit<br>des Tests  | 29 |
| 2.2.3. | Bestimmung der Präzision des Tests                             | 31 |
| 2.2.4. | Verdünnung der Pferdeseren                                     | 31 |
| 2.2.5. | Berechnung des CH <sub>50</sub> -Titers                        | 31 |
| 2.2.6. | Darstellung der Resultate anhand der Box-plot-<br>Methode      | 33 |
| 3.     | RESULTATE                                                      | 35 |
| 3.1.   | Vorversuche mit Proteinase-K                                   | 35 |
| 3.2.   | Präzision des Tests                                            | 35 |
| 3.3.   | Hämolytische Komplementaktivität der getesteten<br>Pferdeseren | 36 |

|    |                      |    |
|----|----------------------|----|
| 4. | DISKUSSION           | 40 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG      | 44 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 45 |

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. COPD beim Pferd

Die chronisch obstruktiven Lungenkrankheiten (COPD) beim Pferd sind nach wie vor von grossem Interesse in der Veterinärmedizin. Der in der Praxis tätige Tierarzt sowie die Kliniken werden oft mit dem Problem der COPD konfrontiert. Nach Gerber (1969) geben Lungenerkrankungen am häufigsten Anlass zu einer Untersuchung und führen oft zu Unbrauchbarkeit der Tiere (Gerber, 1973). Bei einer stichprobenartigen Untersuchung von 197 Tieren aus der schweizerischen Pferdepopulation zeigten 75 Pferde leichtgradige und 29 Pferde mittelgradige COPD (Bracher, 1987). Schatzmann und Gerber (1972) bezeichneten COPD als häufigste Abgangsursache infolge innerer Krankheiten. Ueber Aetiologie und Therapie wird seit langem geforscht, ohne aber zu einem eindeutigen Resultat zu kommen. Eine ausführliche Literaturstudie liegt in Form der Dissertation von U. Damman-Tamke (1982) vor.

Anlässlich eines Ciba guest symposium wurde 1959 der Begriff der chronisch unspezifischen Lungenkrankheiten für den Menschen definiert. Damit sollte Klarheit geschaffen werden in der klinischen Anwendung der Ausdrücke chronische Bronchitis, Asthma und Emphysem:

chronisch unspezifische Lungenkrankheiten oder COPD (chronisch obstruktive Lungenkrankheiten) weisen mindestens eines der folgenden Symptome auf: chronischen Husten und anfallsweise oder persistierende, exzessive Atemnot, die nicht zurückzuführen sind auf:

- lokalklisierte Lungenkrankheiten (z.B. Pneumonie)
- generalisierte spezifische Lungeninfektionen (z.B. Dictiocaulus arnfieldi)
- primäre kardiovaskulär-renale Krankheiten

-Kollagenerkrankungen, generalisierte Fibrosen und Granulome  
-Erkrankungen der Pleura

Die Pferdelunge besitzt submikroskopisch grosse Aehnlichkeiten mit der menschlichen Lunge. Auch die chronischen Atemwegserkrankungen sind mit denen des Menschen vergleichbar (Tyler et al., 1971; Mc Laughlin et al., 1961; Hall und Stark, 1983). 1971 hat Sasse die Definition der Humanmedizin für die Pferdemedizin übernommen.

#### a) klinisches Bild

Bei Pferden mit COPD können die folgenden Abweichungen vom physiologischen Normalzustand auftreten, die jedoch nicht obligat sind, und die in ihrer Intensität starken individuellen und zeitlichen Schwankungen unterworfen sind: erhöhte Ruheatemfrequenz, Husten im Stall und/oder bei der Arbeit, Nasenausfluss, Nüstern- und Afteratmen sowie doppelschlägige Expiration. Bei der Auskultation können pathologische Atemgeräusche wie Rasseln, Giemen und Krepitieren und bei der Perkussion erweiterte Lungengrenzen erkannt werden. Die Ermittlungen von Blutgaswerten zeigen einen erniedrigten Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut (Sasse, 1971). Bei der Endoskopie wird auf das vermehrte Vorhandensein von Schleim in der Trachea mit erhöhter Anzahl neutrophiler Granulozyten, Schleimhautschwellung, verbreiterte Bifurkation und verengte Bronchien geachtet (Bracher, 1987).

Keines der erwähnten Symptome ist jedoch spezifisch für COPD. In der Humanmedizin kommen weitere Untersuchungen zur Anwendung, deren Durchführung beim Pferd jedoch problematisch ist und deren Resultate schwer zu beurteilen sind. Es handelt sich dabei z.B. um Lungenfunktionsprüfungen, wie das Messen der intrathorakalen Druckdifferenz, und um die radiologische Darstellung der Lunge.

b) pathologisch-anatomische Veränderungen

Im Vordergrund steht die chronische Bronchitis und Bronchiolitis mit einer subepithelialen Lymphozyteninfiltration, Schleimhauthypertrophie, Vermehrung der Becherzellen und Schleim in den Lumina der Luftwege. Bei hochgradiger COPD kann eine perivaskuläre und peribronchioläre Fibrose beobachtet werden. Die Alveolarsepten können verdickt sein und eine Hypertrophie der glatten Muskulatur aufweisen (Winder, 1986). Selten werden interstitielle Pneumonien analog der menschlichen Farmerlunge gefunden (Pauli et al., 1972). Nach Hall und Stark (1983) kann die eindeutige Diagnose von COPD erst nach der histologischen Beurteilung der Lunge gestellt werden, was meist erst nach dem Tod des Patienten gemacht wird. Zwar ist es möglich, Lungenbiopsien zu entnehmen (Schatzmann et al., 1974), doch hat sich diese Technik noch nicht durchsetzen können.

c) pathophysiologische Mechanismen

Durch die chronische Entzündung der unteren Atemwege und die Obstruktion kann der alveokapilläre Diffusionsweg vergrößert werden. Der Gasaustausch wird erschwert. Um eine genügende Sauerstoffversorgung des Organismus aufrecht zu erhalten, wird die Atemfrequenz gesteigert (Sasse, 1971; Mc Pherson und Lawson, 1974; Eikmeier, 1977).

d) Aetiologie

Die Aetiologie der COPD ist bis heute ungeklärt. Als initiales Ereignis wird eine Virusinfektion, eventuell mit bakterieller Sekundärinfektion, angenommen (Schatzmann und Gerber, 1972). Eine Möglichkeit für den weiteren Verlauf besteht darin, dass durch Hypersekretion ein persistierender, zäher Schleim entsteht, der einen dauernden Reiz auf die Schleimhaut ausübt und dadurch die Entzündung aufrecht erhält. Auch die Beteiligung einer allergischen Reaktion wird von verschiedenen Autoren

diskutiert und durch Serologie- und Intrakutantests zu beweisen versucht (Schatzmann und Gerber, 1972; Lawson et al., 1979). Nach Mc Pherson und Lawson (1974) wird durch die Infektion die Schleimhaut zerstört und dadurch dem Antigen der Kontakt mit dem immunologisch aktiven Gewebe ermöglicht. Als Allergene werden Mikroorganismen aus Heu und Stroh wie Bakterien, Schimmelpilze und Milben sowie Pflanzenpollen angenommen (Gerber, 1973; Cook, 1965; Halliwell et al., 1979; Mc Pherson et al., 1979; Hockenjos et al., 1981). Einen eindeutigen Einfluss hat die Haltung der Pferde, wobei vor allem das Stallklima und die Art und Qualität des Futters eine Rolle spielen (Cook und Rossdale, 1963; Hall und Stark, 1983; Mc Pherson et al., 1979; Schatzmann und Gerber, 1972). Littlejohn (1979) bezeichnet die COPD als eine Domestikationskrankheit des Pferdes.

Als weiteren Aspekt im Zusammenhang mit dem Auftreten von COPD vermutet Eikmeier (1977) eine gewisse familiäre Häufung. Dem Alter wird insofern eine Bedeutung zugeschrieben, als dass unter den COPD-Patienten vermehrt Pferde im Alter zwischen 6 und 10 Jahren zu finden sind (Mc Pherson et al., 1979).

Eine Rassedisposition könnte in der Tatsache gesehen werden, dass Ponies häufiger erkranken als Vollblüter, doch werden Ponies bezüglich der Qualität von Futter und Einstreu auch öfter schlecht gehalten (Mc Pherson et al., 1979).

Die Möglichkeit, dass eingeatmete Mikroorganismen durch ihre enzymatische Aktivität das Lungengewebe schädigen, wurde in der Dissertation von Grünig (1984) untersucht.

Halliwell et al. (1979) und Edwards et al. (1976) sehen die Ursache der COPD in kleinen Staubpartikeln, die bis in die unteren Atemwege gelangen und durch unspezifische Aktivierung des Komplementsystems für die Entzündung verantwortlich sind.

## 1.2. Das Komplementsystem

Das Komplementsystem setzt sich aus Serumproteinen zusammen, die nach Aktivierung eine Enzymkaskade durchlaufen. Dabei werden biologisch aktive Substanzen freigesetzt, die der frühen Abwehr von Krankheitserregern dienen (Abb. 1).

Durch die Bindung von Antikörpern und gewissen Komplementfaktoren (z.B. C3b) an die Oberfläche von Partikeln werden diese opsonisiert. Die Spaltprodukte von C3 und C5 wirken chemotaktisch auf Leukozyten. Sie bewirken auch die Degranulation von Mastzellen, bzw. der basophilen Granulozyten, sowie die Aggregation von Thrombozyten. Durch die Freisetzung vasoaktiver Amine erfolgt eine anaphylaktische Reaktion mit Kontraktion der glatten Muskulatur, Vasodilatation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Es besteht ein enger Zusammenhang zu den Entzündungsreaktionen. Schifferli et al. (1985) und Naama et al. (1985) beschreiben eine weitere wichtige Funktion des Komplementsystems: Komplement verhindert die Aggregation von Immunkomplexen und macht bereits gebildete Aggregate wieder löslich. Dieser Mechanismus wirkt der Ablagerung von Immunkomplexen im Gewebe entgegen. Somit wird die Entstehung einer Entzündung verhindert, die durch abgelagerte Immunkomplexe über die Komplementaktivierung entstehen würde. Ausserdem sind lösliche Immunkomplexe der Phagozytose besser zugänglich als Präzipitate.

Die Enzymkaskade endet mit der offensichtlichsten Funktion des Komplementsystems, mit der Zellyse (Abb. 1). Durch Membranschädigung können virusinfizierte Zellen, Viren, Bakterien, Mykoplasmen, Spirochaeten, Protozoen, Tumorzellen und Erythrozyten lysiert werden. Im hämolytischen Test wird die Lyse von Erythrozyten zum Nachweis der Komplementaktivität verwendet.

Die Reaktion kann auf zwei verschiedenen Wegen ausgelöst werden: auf dem klassischen und auf dem alternativen Reak-

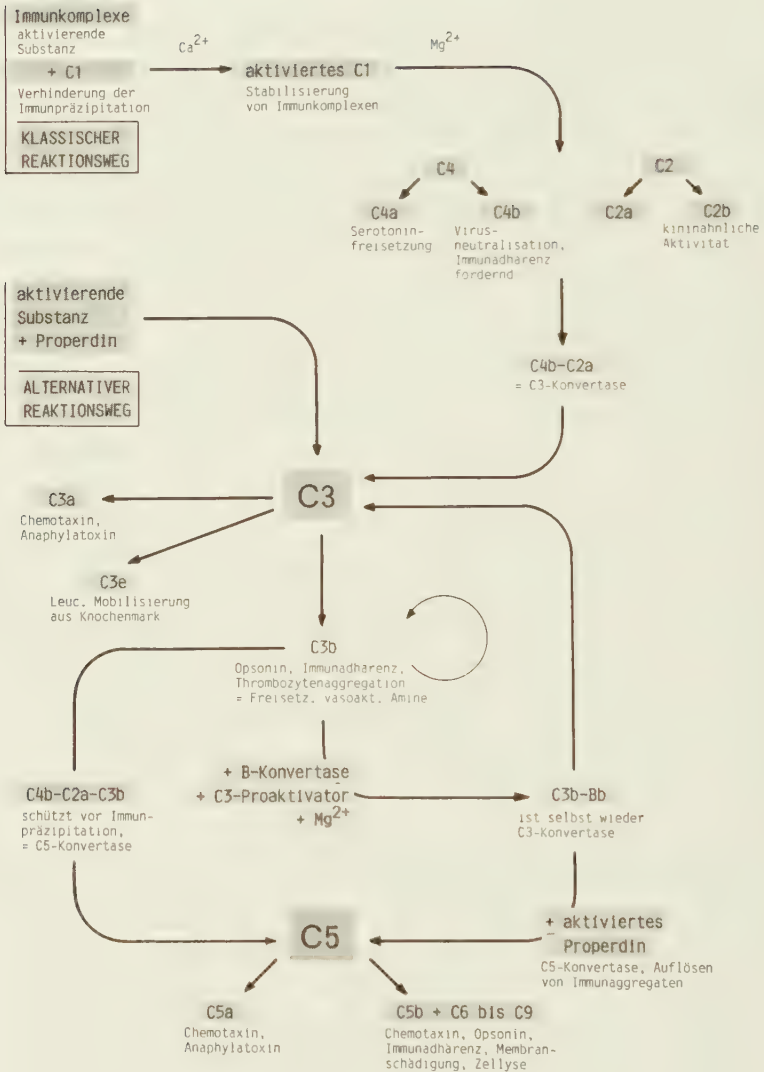


Abbildung 1: Enzymkaskade des Komplementsystems

tionsweg (Abb. 1). Zu den auslösenden Faktoren des klassischen Reaktionsweges gehören Immunkomplexe, die IgG oder IgM enthalten, proteolytische Enzyme, Plasmin und Lipopolisaccharide gramnegativer Bakterien. Der alternative Reaktionsweg kann durch gewisse Arten von Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen und Parasiten ausgelöst werden. Oft genügen auch nur einzelne Substanzen von Pilzen und Bakterien, wie z.B. Zymosan, sowie proteolytische Enzyme oder Endotoxine gramnegativer Bakterien (Linscott, 1986; Powell, 1984; Grant, 1977). Im Zusammenhang mit chronischen Lungenkrankheiten ist die Erkenntnis von Kew et al. (1985) interessant, wonach Zigarettenrauch den alternativen Reaktionsweg aktivieren kann.

Der offensichtlichste Unterschied der beiden Reaktionswege liegt darin, dass der klassische Reaktionsweg eine spezifische Abwehr nach vorausgegangener Auseinandersetzung des Organismus mit dem Krankheitserreger darstellt, der alternative Reaktionsweg einer sofortigen, unspezifischen Abwehr dient (Powell, 1984; Frank, 1979; Müller-Eberhard, 1978).

Die Komponenten des Komplementsystems machen ca. 15% der Serumglobulinfraktion aus. Die Produktion erfolgt in Makrophagen, Milz, Leber, Darmepithel und Knochenmark (Grant, 1977).

Die Nomenklatur der klassischen Faktoren umfasst Zahlen von C1 bis C9. Nach dem Aufspalten werden die Untereinheiten mit kleinen Buchstaben versehen (z.B. C4b). Weitere Faktoren des alternativen Reaktionsweges sind Properdin, C3-Proaktivator und B-Konvertase (Mc Call, 1979).

Um einen unkontrollierten Ablauf der Reaktion zu verhindern, sind Regulationsmechanismen eingebaut. Es handelt sich dabei um Inhibitoren und Inaktivatoren der Faktoren C1, C3b, der Anaphylatoxine und Chemotaxine. Das S-Protein verhindert die membranschädigende Wirkung durch kompetitive Bindung an C5b.



Eine Entgleisung der Reaktion wird auch dadurch verhindert, dass einzelne Komponenten eine sehr kurze Halbwertszeit haben und darum nur in der näheren Umgebung ihres Aktivierungsortes wirken können (Linscott, 1986; Kreutzer et al., 1981).

Das Komplementsystem ist vor allem beim Menschen gut erforscht. Viele einzelne Komponenten sind isoliert worden und stehen für die Diagnose und Forschung zur Verfügung. Das Komplementsystem der Tiere ist beim Rind, Kaninchen und Meerschweinchen am besten bekannt. Beim Pferd sind nur einzelne Aspekte untersucht worden. Der Grund dafür liegt wohl darin, dass die traditionellen Labormethoden und die verfügbaren Antiseren für das Pferd nicht verwendet werden können.

Zur Bestimmung der Gesamtaktivität des Komplementsystems wird der hämolytische Test verwendet. Dabei werden antikörperbeladene Erythrozyten mit dem zu untersuchenden Serum zusammengebracht und die darauffolgende Hämolyse gemessen. Dieser Test wird üblicherweise mit Schafererythrozyten, die mit Kaninchenantikörpern beladen sind, durchgeführt. Diese Versuchsanordnung ist gut geeignet zur Komplementbestimmung im Serum von Mensch, Affe, Hund, Kaninchen und Meerschweinchen. Durch Pferdekompement werden Schafererythrozyten jedoch nicht lysiert, weshalb das Pferdekompement lange als nicht hämolytisch bezeichnet wurde. Erste Versuche mit Meerschweinchenerythrozyten wurden 1902 von Ehrlich und Sachs durchgeführt. Die dabei erreichten  $\text{CH}_{50}$ -Titer<sup>1</sup> waren jedoch sehr gering.

Zur Verbesserung der Methode wurde das Komplement verschiedener Tierarten mit Erythrozyten und Antikörpern anderer Tierarten getestet (van Dijk et al., 1983; Barta und Hubbert, 1978; Barta et al., 1973; Grant, 1977).

<sup>1</sup> $\text{CH}_{50}$ -Titer = Titer, bei dem 50% der Erythrozyten lysiert sind

Barta et al. (1973) untersuchten auch den Einfluss von pH,  $\text{Ca}^{++}$ -,  $\text{Mg}^{++}$ - Konzentration, Ionenstärke, EDTA, Zeit und Temperatur, sowie der Absorbtion von natürlichen Antikörpern.

Es wurde gezeigt, dass Pferdekompement Erythrozyten von Schwein, Kaninchen und Meerschweinchen lysiert. Dabei wurden  $\text{CH}_{50}$ -Titer in der Größenordnung von 10-20 erreicht (Linscott, 1986; Barta und Hubbert, 1978).

Untersuchungen der Komplementaktivität bei pathologischen Zuständen ergaben, dass erhöhte Komplementwerte im Serum vor allem in der akuten Phase von Krankheiten, bei Entzündungen, Infektionen und Verletzungen vorkommen. Erniedrigte Komplementwerte werden bei Leberschäden z.B. durch Vergiftungen, bei Septikämien durch gramnegative Bakterien und bei den meisten Immunkomplexkrankheiten gefunden (Powell, 1984; Corbeil, 1978; Luskin und Tobin, 1982).

### 1.3. Immunkomplexkrankheiten

Immunkomplexkrankheiten entstehen, wenn Antigen-Antikörperkomplexe nicht aus dem Körper eliminiert, sondern im Gewebe abgelagert werden. Dort führen sie über die Aktivierung des Komplementsystems und des Gerinnungssystems zu Gewebsschädigungen (Trautwein, 1982).

Die Pathomechanismen der Immunkomplexkrankheiten können am Beispiel der akuten Serumkrankheit und am Arthus-Phänomen gezeigt werden.

Die akute Serumkrankheit wird durch eine einmalige intravenöse Injektion einer grossen Menge eines heterologen Serums ausgelöst (Abb. 2). Der Körper beginnt mit Antikörperproduktion. Die Elimination geschieht vorerst unter grossem Antigenüberschuss. Die frühen Immunkomplexe sind klein, fixieren wenig Komplement und wirken wenig entzündungserregend. Je mehr Antikörper gebildet werden, desto geringer wird der Antigenüberschuss. Erst die Immunkomplexe bei geringem Antigenüberschuss scheinen pathogene Wirkung zu haben. Durch die Ablagerung im Gewebe und Aktivierung zellulärer und humoraler Mediatoren entstehen entzündliche Prozesse in den Nierenglomeruli, in den Gefässwänden, in der Synovialmembran und im Plexus chorioideus des Gehirns. In dieser Phase sind im Blut weder freies Antigen noch Antikörper vorhanden, dafür aber lösliche Immunkomplexe. Es kommt zu einem vorübergehenden Abfall des Komplementspiegels (Abb. 2).

Bis ca. am 28. Tag nach der Injektion steigt der Antikörpergehalt des Blutes an und die entzündlichen Reaktionen klingen wieder ab (Cochrane und Dixon, 1978; Theofilopoulos und Dixon, 1980).

Wenn man einem bereits immunisierten Organismus kleine Mengen Antigen subkutan injiziert, wird das Arthus-Phänomen beobachtet. Lokal entstehen Immunpräzipitate, die Entzündungsreaktio-

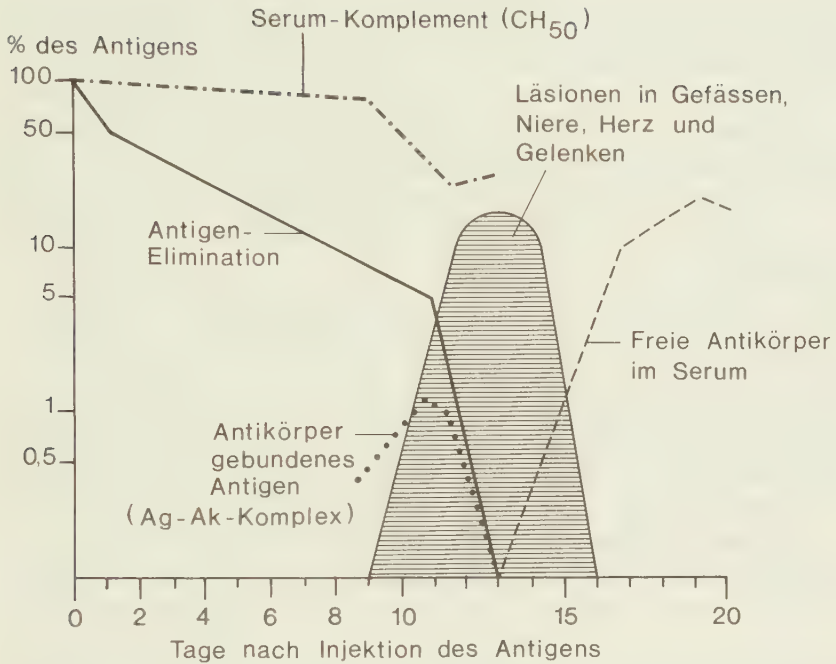


Abbildung 2: Immunphänomene bei akuter Serumkrankheit  
(nach Cochrane u. Dixon, 1978)

nen auslösen. Es kommt zur Oedembildung, einer Vaskulitis mit Infiltration polymorphkerniger Leucozyten, Zerstörung von Blutgefäßen mit Blutungen und zu Gewebsnekrosen.

Bei chronischen Immunkomplexkrankheiten wird das Antigen nicht wie bei der Serumkrankheit und dem Arthus-Phänomen eliminiert. Die Immunkomplexablagerungen persistieren für Monate bis Jahre. Für die Entstehung einer Immunkomplexkrankheit spielen folgende Faktoren eine Rolle: einerseits die immunologische

Reaktionslage des Körpers, d.h. die Funktionstüchtigkeit des lymphoretikulären Systems, das für die Antikörperproduktion und die Produktion von Komplementfaktoren verantwortlich ist. Andererseits müssen Eigenschaften des Antigens, wie Grösse, Valenz und chemische Zusammensetzung beachtet werden. Eine besondere Bedeutung kommt der Menge bzw. der Bildungsrate des Antigens zu, z.B. bei persistierenden Virusinfektionen, bei Autoantigenen oder durch wiederholtes Zuführen des Antigens von aussen.

Immunkomplexkrankheiten aus dem Bereich der Human- und Veterinärmedizin sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Die Ablagerung von Immunkomplexen erfolgt vor allem in Organen, die eine hohe Durchflussrate des Blutes aufweisen, wie Nierenglomerula, Haut, Uvea, Plexus chorioideus des Gehirns und Synovialis. Wird die Serumkrankheit durch tägliche Injektionen in ein chronisches Geschehen übergeführt, sind auch im Lungeninterstitium pathologische Veränderungen sichtbar (Kunkel et al., 1981).

#### Die Rolle des Komplementsystems bei Immunkomplexkrankheiten

Das Komplementsystem hat bei Immunkomplexkrankheiten einerseits pathogene Wirkungen, andererseits erfüllt es wichtige Schutzfunktionen.

Die schädigende Wirkung beruht auf dem Freisetzen von biologisch aktiven Substanzen, wie Entzündungsmediatoren (z.B. C3a, C5a). Zu den Mechanismen, die Schutzfunktionen ausüben, gehören die Hemmung der Bildung von Immunpräzipitaten und das Löslichmachen bereits gebildeter Präzipitate. Damit wird die Elimination von Immunkomplexen durch das lymphoretikuläre System erleichtert und eine Gewebsschädigung verhindert (Schifferli und Peters, 1983; Schifferli et al., 1985; Naama et al., 1983).

Eine weitere wichtige Funktion ist die Immunadhärenz. Die Faktoren C3b und C4b bilden Brücken zwischen Immunkomplexen und Zellen, die Rezeptoren für diese Faktoren haben und bei der Elimination der Immunkomplexe mitwirken. Zu diesen Zellen gehören Phagozyten, Thrombozyten, Lymphozyten und Erythrozyten. Sie sind bei den einzelnen Tierarten und beim Menschen unterschiedlich ausgebildet (Corbeil, 1978; Schifferli et al., 1985).

Als Modelle zur Erfassung der Schutzfunktion des Komplementsystems bei Immunkomplexkrankheiten dienen Individuen mit genetisch bedingtem Komplementdefizit. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass viele Patienten mit genetisch bedingtem Komplementmangel an Immunkomplexkrankheiten leiden, und dass deren Seren verminderte Hemmung der Immunpräzipitation zeigen (Schifferli und Peters, 1983).

Die meisten Patienten mit Immunkomplexkrankheiten haben jedoch keinen genetisch bedingten Komplementmangel. Es wird deshalb nach tiefen Serumkomplementspiegeln gesucht, die häufig bei Immunkomplexkrankheiten beobachtet werden.

Es ist möglich, dass die Faktoren zwar gebildet werden, aber nicht funktionstüchtig sind, oder dass sie durch Inhibitoren gehemmt werden. Ein unkontrollierter Komplementverbrauch kann durch das Fehlen von Regulatoren zustande kommen. Leberschäden, Verabreichen von Kortison und Unterernährung haben eine verminderte Produktion und somit einen Komplementmangel zur Folge (Attkinson und Frank, 1974; Corbeil, 1978; Müller-Eberhard, 1978; Naama et al., 1983).

Hier interessieren einerseits Immunkomplexkrankheiten des Pferdes, andererseits Immunkomplexkrankheiten mit Auswirkungen auf die Lunge.

Immunkomplex-Krankheiten des Menschen

A. Exogene Antigene

I. Infektionserreger

1. Bakterien:

Poststreptokokken-Glomerulonephritis  
Bakterielle Endokarditis  
Meningokokken-Arthritis und -Vaskulitis

2. Viren:

Dengue-Fieber  
Zytomegalie  
Hepatitis, Typ B

3. Protozoen:

Malaria  
Trypanosomiasis  
Toxoplasmose

4. Helminthen:

Schistosomiasis

II. Arzneimittel und Vakzinen

B. Endogene Antigene

1. Immunglobulin-Antigene:

Rheumatoide Arthritis  
Kryoglobulinämie

2. Nukleäre Antigene:

Lupus erythematodes disseminatus  
Andere Autoimmunkrankheiten

3. Tumorantigene:

Leukämie, Lymphosarkom, Melanom  
Karzinom

C. Unbekannte Antigene bei Krankheiten mit Immunkomplexen

1. Kutane Vaskulitis; Periarteriitis nodosa
2. Chronische Glomerulonephritis
3. Idiopathische Thrombozytopenische Purpura
4. Primäre biliäre Zirrhose
5. Pemphigus

Immunkomplex-Krankheiten der Tiere

A. Exogene Antigene

I. Infektionserreger

1. Bakterien und Pilze:

Pneumonitis des Rindes

2. Viren:

Murines Leukose-Virus

Felines Leukose-Virus

Lymphozytäre Choriomeningitis der Maus

Lactat-Dehydrogenase-Virus der Maus

Aleutenkrankheit der Nerze

Infektiöse Anämie des Pferdes

Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease des Rindes

Europäische Schweinepest

Afrikanische Schweinepest

Kanines Adenovirus, Typ I

Feline Infektiöse Peritonitis

B. Endogene Antigene

1. Immunglobulin-Antigene:

Rotlauf-Polyarthritits

2. Nukleäre Antigene:

Lupus erythematodes disseminatus der Maus

Lupus erythematodes disseminatus des Hundes

Autoimmune Thyreoiditis des Huhnes (Obese strain)

C. Unbekannte Antigene bei Krankheiten mit Immunkomplexen

1. Periarteriitis nodosa

2. Chronische Glomerulonephritis

3. Pemphigus des Hundes

Tabelle 1: Immunkomplexkrankheiten bei Mensch und Tier  
(leicht abgeändert nach Trautwein, 1982)

### Immunkomplexkrankheiten des Pferdes

Beim Pferd sind nur das Petechialfieber und die infektiöse Anämie als Immunkomplexkrankheiten bekannt.

Das Petechialfieber ist eine Folgekrankheit der Streptokokkus equi Infektion. Sie tritt bei ca. 1-5% der Pferde auf, die an Druse erkranken. Durch die Ablagerung von Immunkomplexen in den Gefäßwänden und Nierenglomeruli kommt es zu Glomerulonephritis und Kapillarschädigungen mit Kopfoedem und Petechien in Schleimhäuten, Muskeln und Viszera (Roberts und Kelly, 1982; Galan und Timoney, 1985).

Die infektiöse Anämie ist eine persistierende Virusinfektion, die mit Läsionen an der Erythrozytenmembran und an den Nierenglomeruli einhergeht. In der akuten Phase lassen sich im Serum Virus-Virus-Antikörperkomplexe nachweisen, von denen ein Teil in den Nierenglomeruli abgelagert wird (Banks et al., 1972; Mc Guire et al., 1971; Perryman et al., 1971). Die Serumkomplementwerte sind vermindert (Corbeil, 1978) und auf Erythrozyten und in Nierenglomeruli kann der Faktor C3 nachgewiesen werden (Perryman et al., 1971).

Als Besonderheit bei Pferden mit infektiöser Anämie beschreiben Mc Guire et al. (1971) einen Antikörper der IgG(T)-Klasse, der die Komplementfixation hemmt. Die Gesamttaktivität des Komplements hängt vom Verhältnis der komplementfixierenden und der komplementfixationshemmenden Antikörper ab. Es ist denkbar, dass durch diese komplementfixationshemmenden Antikörper die Diagnose einer Virusinfektion, die auf Komplementfixation beruht, gestört werden könnte (Mc Guire et al., 1971).

### Immunkomplexkrankheiten mit Auswirkungen auf die Lunge

In der Humanmedizin sind drei Lungenkrankheiten bekannt, bei denen ein Zusammenhang zu Immunkomplexen angenommen wird: die Farmerlunge, die Taubenzüchterkrankheit und Byssinosis.

Die respiratorischen Symptome der Farmerlunge entstehen innert weniger Stunden nach der Inhalation von Staub von schimmeligem Heu. Es wird eine Sensibilisierung gegen Pilzsporen und Bakterien aus dem Heustaub angenommen, die eine interstitielle Pneumopathie zur Folge hat (Dammann-Tamke, 1982; Edwards, 1976; Wenzel et al., 1971). Ein ähnliches Krankheitsbild ist beim Rind als Urner-Pneumonie bekannt. Das Auftreten von Farmerlunge beim Pferd wird von verschiedenen Autoren diskutiert (Dammann-Tamke, 1982; Grant, 1977). In der Arbeit von Pauli et al. (1972) wird nachgewiesen, dass Farmerlunge beim Pferd vorkommt, und dass dieser Zustand für einen Teil der Fälle von COPD verantwortlich ist.

Die Taubenzüchterkrankheit ist eine Erkrankung der Atemwege mit Fieber, Dyspnoe, Husten, Exsudat in den Lungenalveolen, Neutrophilen im Interstitium und einer interstitiellen Granulomatose als Spätfolge (Kreutzer et al., 1981). In der Arbeit von Caldwell et al. (1973) wird ein möglicher Zusammenhang dieser Symptome mit der Inhalation von Staub aus Vogelvolieren und dem Auftreten von präzipitierenden, komplementfixierenden IgG im Serum aufgezeigt.

Byssinosis tritt bei Arbeitern in Baumwollmühlen auf. Es wird vermutet, dass durch die Inhalation von organischen Substanzen aus dem Baumwollstaub eine Immunkomplexkrankheit ausgelöst wird (Mundie et al., 1985). Nach Kutz et al. (1980) und Wilson et al. (1980) kann Baumwollstaub Komplement in vitro aktivieren.

#### 1.4. Problemstellung

Die Tatsache, dass Komplement ein wichtiges Mediatorensystem für Gewebsschädigungen ist, aber gleichzeitig der Entfernung oder Zerstörung von Antigen dient, lässt die Vermutung aufkommen, dass die Läsionen bei COPD durch Aktivierung des Komplementsystems zustande kommen könnte. Die Aktivierung kann durch inhalierte Partikel, durch Antigene in Form von persistierenden Infektionserregern oder durch im Gewebe abgelagerte Immunkomplexe erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die hämolytische Aktivität im Serum gesunder und an COPD erkrankter Pferde untersucht. Die  $CH_{50}$ -Titer wurden miteinander verglichen und es wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen Komplementaktivierung und COPD zu zeigen.

Gleichzeitig wurde nach einer Möglichkeit gesucht, den hämolytischen Test zur Komplementbestimmung im Pferdeserum zu verfeinern. Die Methode wurde erstmals an einer grösseren Patientengruppe angewendet.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Seren

Es wurden 92 Seren auf ihre hämolytische Komplementaktivität getestet. Die Pferde, von denen die Seren stammten, wurden alle nach dem gleichen Schema untersucht und die Schwere der Lungenerkrankung als leicht-, mittel- oder hochgradig beurteilt (Tab. 2, Grünig et al., 1985). In der vorliegenden Arbeit wurden die Pferde mit mittel- und hochgradiger COPD in einer Gruppe zusammengefasst.

Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass nur Seren von Tieren verwendet wurden, die folgende Kriterien erfüllten:

1. nicht an einer Infektionskrankheit erkrankt waren
2. nicht kurz zuvor operiert worden waren
3. keine Medikamente erhalten haben (v.a. keine Kortikosteroide und kein Phenylbutazon)
4. nicht verdächtig waren für eine Infektion mit Lungenwürmern

Die Seren stammten von zwei Pferdeguppen:

Gruppe 1: Die Seren wurden uns von der vet. med. Klinik des Tierspitals Zürich (Dr. M. Hermann) zur Verfügung gestellt. Sie stammten von Tieren, die wegen chronischen Atemwegserkrankungen in die Klinik eingeliefert wurden.

Gruppe 2: Diese Seren stammten aus der Arbeit von Bracher (1987). Es wurden Pferde aus der schweizerischen Pferdepopulation nach dem oben erwähnten Schema untersucht. Als weiteres Kriterium wurde die Menge der neutrophilen Granulozyten im Tracheobronchialsekret zur Diagnosestellung herbeigezogen. Die Tiere

|                                                      | SCHWEREGRADE                                                                       |                                                               |      |                                       |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------|---------------------------------------|
|                                                      | leichtgradig                                                                       | DER                                                           | COPD | hochgradig                            |
| Vorbericht                                           | Nasenausfluss, (ev.) Husten bei Belastung und / oder im Stall, ev. Leistungsabfall |                                                               |      |                                       |
| Ruheatemfrequenz                                     | normal                                                                             | ev. erhöht                                                    |      | erhöht                                |
| Atemtyp                                              | leicht betonte Expiration                                                          | abdominal betonte Expiration                                  |      | deutlich abdominal betonte Expiration |
| Auskultation                                         | Rasseln                                                                            | Rasseln, Glemern, Krepittieren                                |      | Rasseln, Glemern, Krepittieren        |
| Husten                                               | rauh und produktiv                                                                 | mehr oder weniger rauh                                        |      | eher trocken, kraftlos                |
| PO <sub>2</sub>                                      | um 90                                                                              | 85 oder darunter                                              |      | 80 und darunter                       |
| Lungengrenzen                                        | normal                                                                             | normal oder leicht erweitert                                  |      | meist erweitert                       |
| Endoskopie:<br>- Schleimmenge<br>- Schleimkonsistenz | wenig - mässig flüssig                                                             | mässig - viel entweder flüssig und im See angeordnet oder zäh |      | mässig - viel zäh, klebend            |
| - Sonstiges                                          |                                                                                    |                                                               |      | Schleimhautknötchen                   |
| Arbeitsprobe                                         |                                                                                    |                                                               |      |                                       |
| - Nasenausfluss                                      | wenig                                                                              | mittel                                                        |      | viel                                  |
| - Husten                                             | eventuell                                                                          | meist                                                         |      | immer                                 |
| - Erholungswerte                                     | ev. normal                                                                         | ev. verzögert                                                 |      | verzögert                             |

Tabelle 2: Kriterien für die Gruppierung der Pferde (nach Grünig et al. 1985)

wurden in die Gruppen gesund, leichtgradige COPD, sowie mittel-/hochgradige COPD eingeteilt. Bei den Pferden handelte es sich einerseits um Tiere der eidg. Militärpferdeanstalt (EMPFA) in Bern, andererseits um Tiere, die nicht wegen Atemwegsproblemen im Tierspital Zürich waren (z.B. zum Hufbeschlag, wegen Lahmheit oder zur Ankaufsuntersuchung) und deren Besitzer mit dem Atemwegsuntersuch einverstanden waren.

Die Seren wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und für den Versuch nur einmal aufgetaut.

#### 2.1.2. Erythrozyten

Die Erythrozyten stammten von weiblichen Meerschweinchen, Tricolor, Alter ca. 7 Monate, Gewicht ca. 900 g. Die Tiere wurden durch Genickschlag betäubt und entblutet. Das Blut wurde in Alsever-Lösung mit einem Zusatz von Penicillin/Streptomycin bei  $2^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Durch den Antibiotikazusatz wurden die Resultate nicht verändert und die Erythrozyten konnten während ca. 10 Tagen gelagert werden.

Die Erythrozyten wurden wie folgt gelagert:

Blut und Alsever-Lösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Das Verhältnis der Antibiotikallösung zur Blut-Alsever-Lösung betrug 1:100.

Herstellung der Alsever-Lösung:

20,5 g Glucose wasserfrei, 8,0 g Natriumcitrat und 4,2 g NaCl pro analysi wurden in ca. 800 ml destilliertem Wasser gelöst. Dann wurde der pH durch Zugabe von 4-5 ml 10%-iger Zitronensäure (acid.citri.) auf 6,1 eingestellt und das Volumen auf 1000 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  ergänzt.

#### Herstellung der Antibiotikallösung:

Die Antibiotikallösung bestand aus 10'000 IE/ml Penicillin und 10'000 µg/ml Streptomycin. Sie wurde bei -20°C gelagert.

#### 2.1.3. Antikörper gegen Meerschweinchenerythrozyten

Einem Pferd wurden Meerschweinchenerythrozyten intravenös injiziert. Unerwarteterweise trat eine starke anaphylaktische Reaktion auf, die auf Antikörper im Pferdeserum gegen Erythrozyten verschiedener anderer Spezies zurückgeführt werden kann (Barta et al., 1973). Aufgrund dieses Zwischenfalles wurden weitere Erythrozyteninjektionen unterlassen. Nach 10 Tagen wurden diesem Pferd Blutproben entnommen, da nach dieser Zeit die IgM-Produktion am grössten ist. Um das Komplement zu zerstören, wurde das Serum während 20 Min. auf 60°C erhitzt und anschliessend in Portionen zu 100 µl bei -80°C zur Aufbewahrung eingefroren.

#### 2.1.4. Puffer (nach Levine, 1978)

Die 10 x konzentrierte Stammlösung enthielt 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 mit 1,4 M NaCl, 4,95 mM MgSO<sub>4</sub> und 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>.

Sie wurde folgendermassen hergestellt:

81,6 g NaCl und 12,1 g Tris (hydroxymethyl) aminomethan wurden in ca. 800 ml H<sub>2</sub>O dest. aufgelöst. Danach wurden 33 ml 0,15 M MgSO<sub>4</sub> und 15 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O zugegeben und mit ca. 85 ml 1,0 M HCl der pH auf 7,4 eingestellt. Die Gesamtmenge wurde mit H<sub>2</sub>O dest. auf 1000 ml ergänzt.

Die Stammlösung wurde in Portionen bei -20°C aufbewahrt. Für den Gebrauch wurde die Stammlösung mit H<sub>2</sub>O dest. 1 : 10 verdünnt.

2.1.5. Spezielle Reagenzien und Materialien

- Proteinase K, EC 3,4.21.14, Boehringer, Mannheim, zur Analyse
- Photometer, Spectronic 601, Bausch und Lomb
- Rolle, Coulter- Mixer, Instrumentengesellschaft
- 1 ml Röhrchen, Nunc Cryotubes, Gibco AG, Basel, Art. Nr. 3-66656

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Hämolytischer Complement Assay

Es wurde der Test nach Levin (1978) mit wenigen Modifikationen angewendet.

Das Prinzip des hämolytischen Tests zur Bestimmung der Gesamtaktivität von Komplement im Serum war folgendes:

Zu frischem Serum (Komplement) wurde eine Suspension von antikörperbeladenen Erythrozyten (Antigen-Antikörper-Komplex) gegeben. Dadurch wird das Komplementsystem aktiviert, es resultiert die Lyse der Erythrozyten.

Anhand der Verdünnungsreihe des Systems wurde derjenige Titer bestimmt, bei dem 50% der Erythrozyten lysiert sind ( $CH_{50}$ -Titer).

### Vorbereiten der Erythrozyten

Zuerst wurden die Erythrozyten gewaschen. Ca. 2,5 ml Meer-schweinchenblut-Alsever-Gemisch wurden zentrifugiert und der Ueberstand abpipettiert. Die gepackten Erythrozyten wurden in ca. 4 ml Puffer aufgeschwemmt, zentrifugiert und der Ueberstand abpipettiert. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt war der Ueberstand klar und farblos. Nun wurden die gewaschenen Erythrozyten sensibilisiert, d.h. mit Antikörpern beladen. Dazu wurde das Antiserum (Hämolysin) 1:1000 mit Puffer verdünnt, die gepackten Erythrozyten wurden 1:20 mit Puffer verdünnt. Nun wurden verdünntes Antiserum sowie verdünnte Erythrozytensuspension im Verhältnis 1:1 gemischt und während 15 Min. bei 37°C auf der Rolle inkubiert. Danach wurde das Gemisch noch einmal 1:20 mit Puffer verdünnt.

Die sensibilisierten Erythrozyten konnten während max. 6 Std. auf Eis aufbewahrt werden.

### 2.2.2. Vorversuche zur Verbesserung der Empfindlichkeit des Tests

---

Das Vorbereiten der Erythrozyten wurde gegenüber 2.2.1 wie folgt ergänzt: Nach dem Waschen der Erythrozyten wurde ein Teil gepackte Erythrozyten mit 9 Teilen Proteinase-K (1%-ige Lösung) während 35 Min. bei 37°C auf der Rolle inkubiert (Roelke und Uhlenbruck, 1969). Danach wurden die Erythrozyten wieder 4 mal in Puffer gewaschen und es folgte das Sensibilisieren wie unter 2.2.1. beschrieben.

Es wurden Versuchsserien mit Erythrozyten von 12 Meerschweinchen durchgeführt und die  $CH_{50}$ -Titer, sowie die Stabilität der Erythrozyten getestet. In Parallelversuchen wurden unbehandelte und mit Proteinase-K vorbehandelte Erythrozyten geprüft.

Das Standardserum wurde in je 7 Verdünnungen getestet, und zwar von 1:2 bis 1:20 mit den unbehandelten Erythrozyten und von 1:6 bis 1:40 mit den Proteinase-K vorbehandelten Erythrozyten. In die Nunc-Röhrchen wurden 500  $\mu$ l Puffer, 100  $\mu$ l der jeweiligen Serumverdünnung und 100  $\mu$ l sensibilisierte Erythrozyten gegeben. Als Kontrollwerte wurden die Eigenhämolyse der Erythrozyten ( $K_1$ ), die Totalhämolyse ( $K_2$ ) und die Eigenfarbe des Serums, die Serumkontrolle ( $K_3$ ) bestimmt (Tab. 3). Diese Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt.

Nun wurden die Röhrchen während 60 Min. bei 37°C auf die Rolle gelegt. Danach wurden sie bei 3°C zentrifugiert. Die Extinktion des Ueberstandes wurde sofort nach dem Zentrifugieren im Photometer bei 413 nm gemessen.

Da die Empfindlichkeit des Tests deutlich verbessert werden konnte und die Reproduzierbarkeit erhalten blieb (siehe Resultate), wurden für die weiteren Versuche nur noch mit Proteinase-K vorbehandelte Erythrozyten verwendet.

1  
30  
1

|                                 | Röhrchennummern |             |             |             |             |             |             | K <sub>1</sub><br>Eigen-<br>hämolysen | K <sub>2</sub><br>Total-<br>hämolysen | K <sub>3</sub><br>Serum-<br>kontrolle |
|---------------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|                                 | A               | B           | C           | D           | E           | F           | G           |                                       |                                       |                                       |
| Puffer                          | 500             | 500         | 500         | 500         | 500         | 500         | 500         | 600                                   | -                                     | 600                                   |
| Komplement =<br>Serumverdünnung | 100<br>1:5      | 100<br>1:10 | 100<br>1:15 | 100<br>1:20 | 100<br>1:25 | 100<br>1:30 | 100<br>1:40 | -                                     | -                                     | 100<br>1:10                           |
| sensibilisierte<br>Erythrozyten | 100             | 100         | 100         | 100         | 100         | 100         | 100         | 100                                   | 100                                   | -                                     |
| H <sub>2</sub> O dest.          | -               | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -                                     | 600                                   | -                                     |

Tabelle 3: Versuchsanordnung (Angaben in µl)

### 2.2.3. Bestimmung der Präzision des Tests

#### Präzision in der Serie

Die Komplementaktivität eines 1:30 verdünnten Serums wurde 20 mal ermittelt, gleichzeitig wurde auch der Kontrollwert der Eigenhämolyse in 20 verschiedenen Röhrchen gemessen.

Um den Einfluss der Totalmenge pro Röhrchen zu bestimmen, wurden je 10 mal 350  $\mu$ l und 10 mal 700  $\mu$ l Totalmenge gewählt.

#### Präzision von Tag zu Tag

Der  $\text{CH}_{50}$ -Titer eines Standardserums wurde 26 mal an 13 verschiedenen Tagen bestimmt. Das Standardserum wurde jeweils am Anfang und am Ende der täglichen Versuchsreihe des Hauptversuchs mitgeführt (siehe 2.2.4.).

### 2.2.4. Verdünnung der Pferdeseren

Von jedem der 92 Seren wurden 8 Verdünnungen im Doppel getestet: 1:5; 1:10; 1:15; 1:20; 1:25; 1:30; 1:40; 1:50. Die Versuchsanordnung entsprach jener in Tab. 3.

### 2.2.5. Berechnung des $\text{CH}_{50}$ -Titers

Vom Mittelwert der Extinktion der Doppelwerte wurden die Kontrollwerte der Eigenhämolyse ( $K_1$ ) und der Serumkontrolle ( $K_3$ ) abgezogen.

Der Kontrollwert der Eigenhämolyse ergab sich aus dem Mittelwert aller  $K_1$ -Werte des Tages. Der Kontrollwert der Serumkontrolle wurde in der Serumverdünnung 1:10 gemessen. Daraus wurden die Werte für die Verdünnungen 1:5, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40 berechnet. In separaten Versuchen hat sich gezeigt, dass so die gleichen Werte erhalten wurden, wie wenn die Serumverdünnungen einzeln im Photometer gemessen wurden.

Zur Darstellung der Hämolysekurve wurden auf der x-Achse die Titer, auf der y-Achse die Hämolyse in % der Totalhämolyse aufgetragen (Abb. 3).

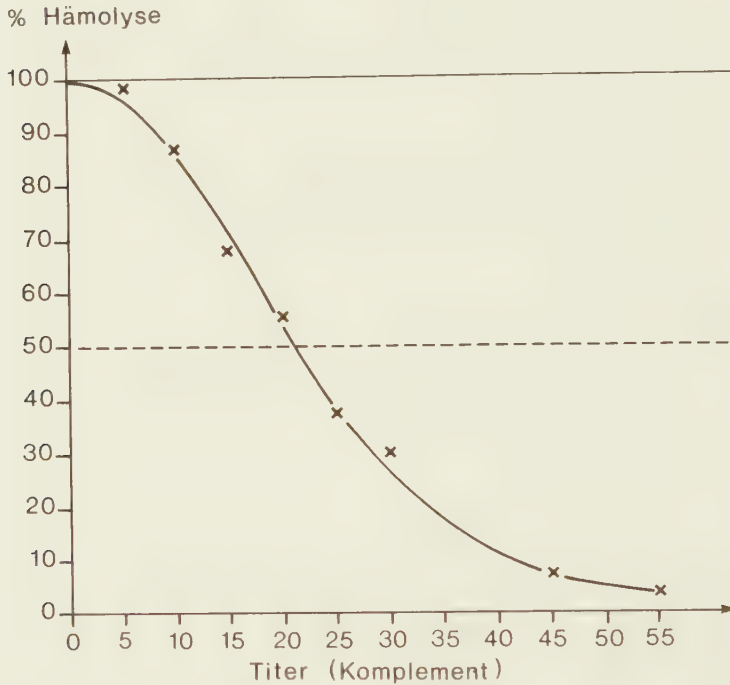


Abbildung 3: Beispiel einer Hämolysekurve

Durch halblogarithmische Darstellung wurde der uns interessierende Bereich der 50%-Hämolyse in eine Gerade übergeführt und konnte berechnet werden (Abb. 4) (Handbuch zu Texasinstruments TJ.55.II, lineare Regression).

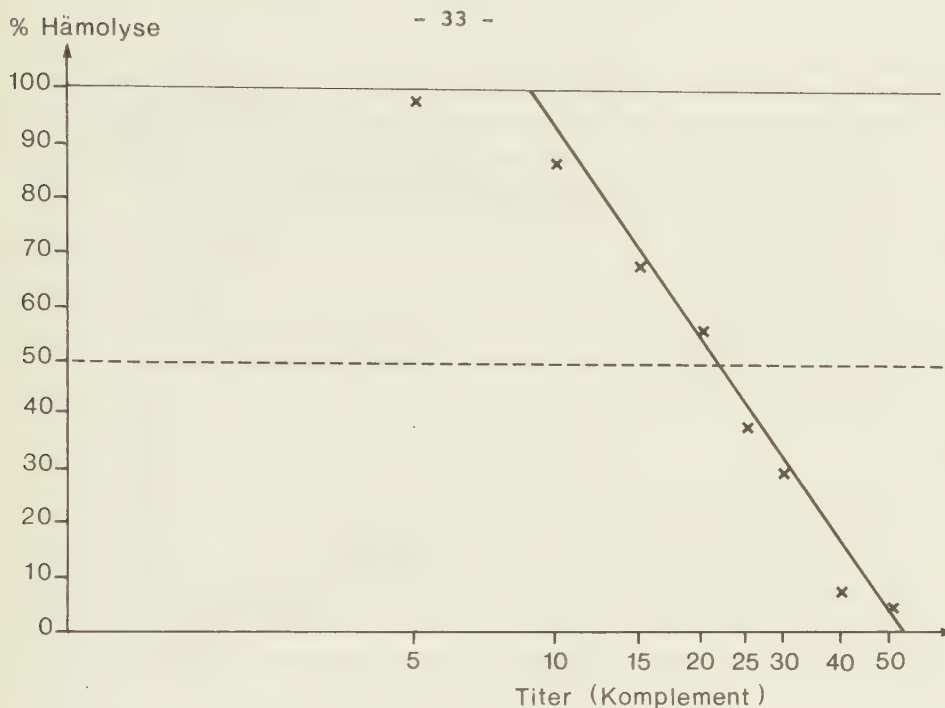


Abbildung 4: Halblogarithmische Darstellung einer Hämolysekurve

#### 2.2.6. Darstellung der Resultate anhand der Box-plot-Methode

Die Darstellung von Messwerten in der Box-plot-Methode (Eggenberger und Thun, 1984) sieht folgendermassen aus:

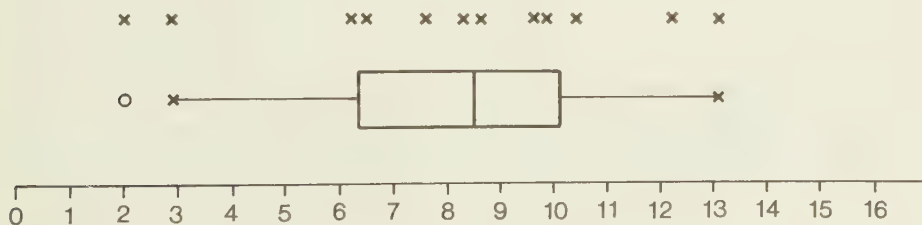


Abbildung 5: Box-plot

Die Box enthält 50% der Messwerte und wird durch die Mediane getrennt. Die Werte innerhalb der horizontalen Linie entsprechen etwa dem 95%-Bereich normalverteilter Messwerte. Extremwerte ausserhalb dieses Bereiches werden mit "0" gekennzeichnet.

### 3. RESULTATE

#### 3.1. Vorversuche mit Proteinase-K

Im Vorversuch wurde abgeklärt, wie der hämolytische Komplementtest empfindlicher gemacht werden könnte.

Durch die Vorbereitung der Erythrozyten mit Proteinase-K, einer Protease aus *Tritirachium album*, wurde versucht, die  $CH_{50}$ -Titer zu erhöhen. Dieses Verfahren bewirkt eine Strukturveränderung der Erythrozytenmembran (Roelcke und Uhlenbruck, 1969).

In Versuchsserien mit behandelten und unbehandelten Erythrozyten von 12 Meerschweinchen wurde festgestellt, dass es durch Verwendung der mit Proteinase-K vorbehandelten Erythrozyten zu höheren Hämolysewerten kam. Der  $CH_{50}$ -Titer der behandelten Erythrozyten lag für eine bestimmte Serumprobe bei ca. 14 ( $s=2,8$ ). Der  $CH_{50}$ -Titer der gleichen Probe im Test mit unbehandelten Erythrozyten lag bei ca. 6 ( $s=0,6$ ).

Die Stabilität der Erythrozyten wurde durch Proteinase-K ebenfalls positiv beeinflusst. Der Mittelwert der Extinktion des Kontrollwertes der Eigenhämolyse lag bei den vorbehandelten Erythrozyten bei 0,035 ( $s=0,019$ ), bei den unbehandelten Erythrozyten bei 0,059 ( $s=0,013$ ).

#### 3.2. Präzision des Testes

##### Präzision in der Serie

Der Test wurde je 10 mal mit einem 1:30 verdünnten Serum angesetzt und zwar mit einer Totalmenge pro Röhrchen von 350  $\mu$ l bzw. 700  $\mu$ l. Gleichzeitig wurde der Kontrollwert der Eigenhämolyse in 20 verschiedenen Röhrchen gemessen.

Es bestand kein Unterschied zwischen der Totalmenge von 350  $\mu$ l

und der Totalmenge von 700  $\mu$ l. Die durchschnittliche Extinktion betrug bei 350  $\mu$ l 0,183 und bei 700  $\mu$ l 0,191, mit einer Standardabweichung von 10% bzw. 12%. Die Abweichung durch unterschiedliche Eigenhämolyse betrug nur 1%.

#### Präzision von Tag zu Tag

Am Anfang und am Ende jeder täglichen Versuchsreihe wurde ein Standardserum im Doppel mitgeführt. Der  $\text{CH}_{50}$ -Titer der 26 Hämolysekurven der Standardseren betrug im Mittel  $14,9 \pm 1,6$ . Der Variationskoeffizient betrug damit 11%.

### 3.3. Hämolytische Komplementaktivität der getesteten Pferdeseren

Es wurden 92 Seren im hämolytischen Test untersucht. Die Seren stammten einerseits von Pferden, die wegen chronischen Atemwegserkrankungen ins Tierspital Zürich eingeliefert wurden (Gruppe 1), andererseits von Pferden der EMPFA und von Pferden, die nicht wegen Atemwegsproblemen am Tierspital Zürich waren (Gruppe 2). Die Pferde wurden alle nach dem gleichen Schema untersucht (Tab. 2) und nach dem Schweregrad der COPD in Gruppen eingeteilt.

#### Gruppe 1

Es wurden 34 Seren von Pferden mit hoch- und mittelgradiger COPD und 20 Seren von Pferden mit leichtgradiger COPD untersucht. Wie in Abb. 6 und in Tab. 4 dargestellt, bestand kein Unterschied in den  $\text{CH}_{50}$ -Titern der Seren der Pferde mit hoch- und mittelgradiger COPD und derer mit leichtgradiger COPD.

Die Mittelwerte der  $\text{CH}_{50}$ -Titer betrugen 26,0 bzw. 21,3. 50% der  $\text{CH}_{50}$ -Titer lagen in einem Bereich von 17-34 bzw. 18-25 (Tab. 4).

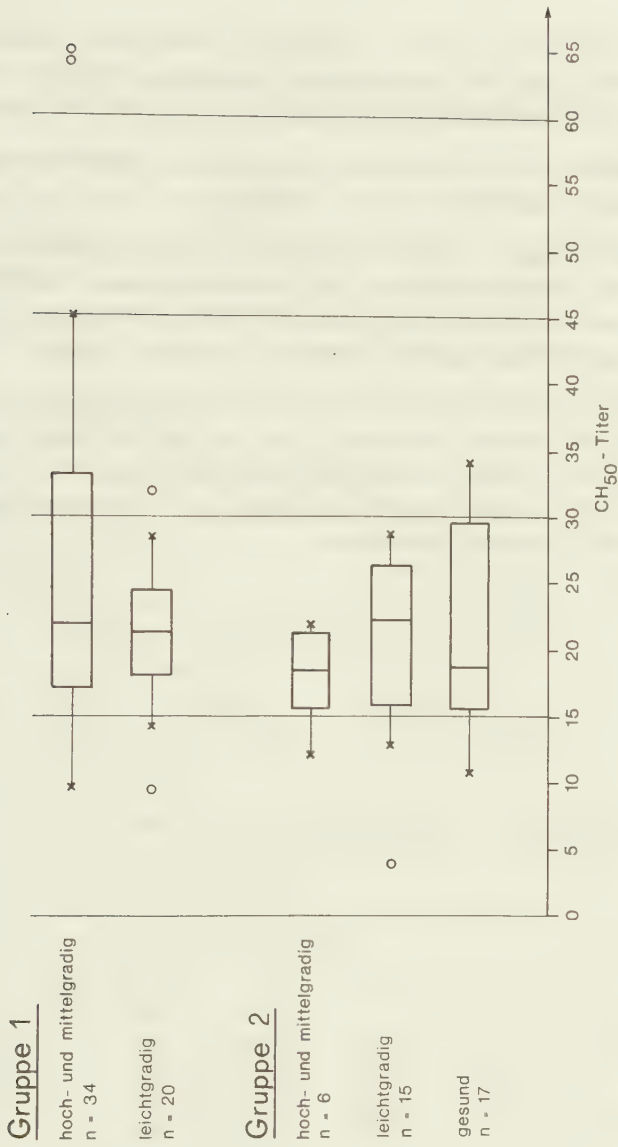


Abbildung 5: CH<sub>50</sub>-Titer der getesteten Pferdeseren. Graphische Darstellung der Einzelwerte und Zusammenfassung der Box-plot Methode

### Gruppe 2

Die Gruppe der mittel- und hochgradig erkrankten Pferde enthielt 6 Seren, die der leichtgradig erkrankten 15 Seren und die der subklinisch erkrankten und fraglich gesunden 17 Seren.

Auch hier bestand kein Unterschied zwischen den verschiedenen Patientengruppen bezüglich der  $CH_{50}$ -Titer (Abb. 6 und Tab. 4).

Bei allen drei Gruppen lagen 50% der  $CH_{50}$ -Titer zwischen ca. 15 und 25. Die Mittelwerte der  $CH_{50}$ -Titer betrugen 18,0 für die mittel- und hochgradig erkrankten Tiere, 20,4 für die leichtgradig erkrankten und 21,5 für die gesunden Pferde.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass von allen untersuchten Seren 50% der  $CH_{50}$ -Titer zwischen 16 und 34 und 95% der Titer zwischen 4 und 65 liegen. Vergleicht man die Gruppe 1 mit der Dunkelziffer, kann man keine Tendenz zu erhöhten oder erniedrigten  $CH_{50}$ -Titern feststellen.

|                           | Anzahl<br>Seren | $\bar{x}$ | s    | $V_K$ |
|---------------------------|-----------------|-----------|------|-------|
| <u>Gruppe 1</u>           |                 |           |      |       |
| mittel- und<br>hochgradig | 34              | 26,0      | 13,2 | 50,8  |
| leichtgradig              | 20              | 21,3      | 5,2  | 24,4  |
| <u>Gruppe 2</u>           |                 |           |      |       |
| mittel- und<br>hochgradig | 6               | 18,0      | 13,8 | 76,7  |
| leichtgradig              | 15              | 20,4      | 6,8  | 33,3  |
| gesund                    | 17              | 21,5      | 7,8  | 34,0  |

Tabelle 4: Berechnete Mittelwerte der  $CH_{50}$ -Titer ( $\bar{x}$ ), der Standardabweichung (s) und des Variationskoeffizienten ( $V_K$ )

#### 4. DISKUSSION

---

In dieser Arbeit wurde der hämolytische Test zur Bestimmung der Komplementaktivität angewendet. Der  $CH_{50}$ -Titer wurde in Seren von gesunden Pferden und in Seren von Pferden mit unterschiedlich schwerer COPD bestimmt.

Um die kleinen Titer, die bisher im hämolytischen Test mit Pferdekompiment erreicht wurden zu verbessern, wurde der Test nach Levine (1978) durch die Verwendung von mit Proteinase-K vorbehandelten Meerschweinchenerythrozyten verfeinert.

Bis jetzt wurden hämolytische Komplementbestimmungen beim Pferd von Rice und Boulanger (1952) und Barta et al. (1973 und 1978) durchgeführt. Die Versuche von Rice und Boulanger (1952) mit Kaninchenerythrozyten und Schafantikörpern ergaben Titer von ca. 25. Barta et al. testeten 1973 Erythrozyten verschiedener Tierarten, die mit Kaninchenantikörpern sensibilisiert worden waren, bei pH 7,3, und erhielt mit Schweineerythrozyten Titer von 13, mit Meerschweinchenerythrozyten Titer von 10 und mit Kaninchenerythrozyten Titer von 7. Mit Erythrozyten von Schaf, Rind und Pferd konnte keine Hämolyse festgestellt werden. 1978 erreichten Barta und Barta mit Schweineerythrozyten und Kaninchenantikörpern bei pH 9 einen Titer von 16.

Die von uns verwendete Methode zeigte also etwas höhere Titer. Sie war auch gut reproduzierbar: 26 Hämolysekurven, die an 13 verschiedenen Tagen mit Standardserum bestimmt wurden, ergaben  $CH_{50}$ -Titer von  $14,9 \pm 1,6$ . Der Variationskoeffizient betrug also nur 11%. Brenner (1971) bezeichnete den hämolytischen Test als schlecht reproduzierbar. Seine Versuche mit Schaferythrozyten und humanem Komplement wiesen einen Variationskoeffizienten bis zu 27,9% auf.

Im Vergleich mit anderen Spezies, ist das Pferdekompiment nur schwach hämolytisch. Die  $CH_{50}$ -Titer von menschlichen Seren

liegen bei 150-250 (Rynes et al., 1984), von Rinderseren bei 150-300, von Hundeseren bei 100-300 (Linscott, 1986). Die geringen Titer von Pferdeseren könnten der relativ hohen Aktivität von einigen Komplementinaktivatoren oder dem schnellen Zerfall der Komponente C4b2a3b zugeschrieben werden (Barta und Barta, 1978). Es ist denkbar, dass das Pferdekompement aufgrund seiner geringen Aktivität die Schutzfunktionen vor Ablagerung von Immunkomplexen nicht im gleichen Ausmass ausüben kann wie dies bei anderen Spezies der Fall ist. Daraus könnte eine speziesbedingte Neigung des Pferdes zu Immunkomplexkrankheiten abgeleitet werden.

Bisher liegen keine Arbeiten über Komplementbestimmungen bei Pferden mit COPD vor. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen COPD und hämolytischen Komplementtitern gezeigt werden. Dies muss aber nicht bedeuten, dass das Komplementsystem nicht an der Pathogenese der COPD beteiligt ist. Komplement könnte lokal im Lungengewebe aktiviert werden und dort pathologische Veränderungen bewirken, ohne dass die Serumwerte beeinflusst werden. Bei Menschen mit Byssinosis waren die C<sub>3</sub>-Konzentrationen im Serum gegenüber Gesunden unverändert (Mundie et al., 1985). Es wird dennoch angenommen, dass kleinste aktivierte Komplementmengen Entzündungen bewirken können (Mundie et al., 1985). Auch bei der rheumatoiden Arthritis des Menschen sind die Komplementwerte nur lokal, d.h. in der Synovia, erniedrigt. Im Serum sind sie unverändert (Kunkel et al., 1981; Rynes et al., 1974). Ein weiterer Aspekt, der bei der Beurteilung der CH<sub>50</sub>-Titer im Zusammenhang mit der COPD erwähnt werden muss, ist der folgende: COPD ist keine Krankheit, sondern ein Symptomenkomplex (Gerber, 1969; Sasse, 1971). Als Ursache werden eine Vielzahl exo- und endogener Faktoren diskutiert (Eyre, 1972; Littlejohn, 1979; Dammann-Tamke, 1982). Anhand des Krankheitsbildes können die verschiedenen Aetiologien jedoch nicht voneinander abgegrenzt

werden. Es wäre nun denkbar, dass ein Teil der Fälle von COPD durch komplementverbrauchende Prozesse ausgelöst wird, dass diese Fälle aber nicht erkannt werden können.

Um genauere Aussagen über die Rolle des Komplementsystems bei COPD machen zu können, sollte der hämolytische Test mit anderen Methoden der Komplementbestimmung verglichen werden können. Bisher stehen jedoch keine routinemässig anzuwendende Tests für den Komplementnachweis im Pferdeserum zur Verfügung.

Als zusätzliche Methode könnte der Konglutinintest verwendet werden. Hierbei werden antikörperbeladene Erythrozyten in Anwesenheit von Komplement und Konglutinin agglutiniert. Der Konglutinintiter von Pferdekompement ist viel höher als der hämolytische Titer. Rice und Baulanger (1952) erhielten bei der Verwendung von Schafererythrozyten und Konglutinin aus Rinderseren Titer von 1300. Von Barta und Barta (1978) wurden Konglutinintiter mit Pferdeserum in der Grössenordnung von 40 bis 300 gemessen. Es wurden Schafererythrozyten, Kaninchenantikörper und Kaninchenimmunokonglutinin verwendet.

Eine weitere wertvolle Information wäre der Test mit einzelnen Komponenten des Komplementsystems. Informationen über einzelne Komponenten im Pferdeserum sind den Arbeiten von Perryman et al. (1971) und Mc Donald und Burger (1979) zu entnehmen. Perryman et al. (1971) hat zur Erforschung der hämolytischen Anämie  $C_3$  isoliert. Er entdeckte  $C_3$  auf Erythrozyten und Nierenglomeruli, sowie erniedrigte  $C_3$ -Werte im Serum von 6 von 12 infizierten Pferden. Mc Donald und Burger (1979) konnten das Fragment  $C_{1q}$  reinigen. Es zeigte Kreuzreaktionen mit humanem  $C_{1q}$ .

Für die Untersuchung einzelner Faktoren im Serum von Mensch und Meerschweinchen stehen Immunseren mit isolierten Komponenten zur Verfügung. Barta und Barta (1978b) testeten Pferdekompement mit diesen käuflichen Komponenten. Es

resultierten tiefe Titer für  $C_2$  bis  $C_5$  (kleiner als 20), während für  $C_1$ ,  $C_6$  bis  $C_9$  Titer von 1600 und mehr erreicht wurden. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die tiefen Titer den wirklichen Wert der Komplementkomponenten angeben, oder ob Inhibitoren vorhanden sind (Barta und Barta 1978).

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

---

Zur Komplementfixation im Pferdeserum wurde ein Test erarbeitet und im Zusammenhang mit der COPD des Pferdes angewendet. Es wurden 92 Seren von Pferden mit unterschiedlichem Schweregrad an COPD untersucht. Die Pferde stammten aus zwei verschiedenen Gruppen: einerseits handelte es sich um Tiere, die wegen chronischen Atemwegserkrankungen an die Klinik des Tierspitals Zürich eingeliefert wurden ( $n=54$ ), andererseits um Stichproben aus der schweizerischen Pferdepopulation ( $n=38$ ).

Die Komplementaktivität wurde anhand des hämolytischen Testes mit sensibilisierten Meerschweinchenerythrozyten gemessen und der  $CH_{50}$ -Titer bestimmt. 50% der  $CH_{50}$ -Titer lagen im Bereich von 16 bis 34, Extremwerte reichten von 4 bis 65. Beim Vergleich der Werte der einzelnen Gruppen konnte keine Abhängigkeit vom Schweregrad der COPD festgestellt werden.

Da die COPD ein lokales Geschehen ist, könnte Komplement in der Lunge aktiviert werden und entzündliche Reaktionen zur Folge haben, ohne dass die Komplementwerte im Serum verändert werden.

Um die Resultate aus dem hämolytischen Test genauer beurteilen zu können, sollten Werte aus anderen Versuchen zum Vergleich herangezogen werden können, wie z.B. Konglutinintiter oder die Bestimmung von einzelnen Komponenten.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

---

ATTKINSON, A.O. and FRANK, M.M. (1974):

Complement independent clearance of IgG-sensitized erythrocytes inhibition by cortisone

Blood 44, 629-637

BANKS, K.L., HENSON, J.B. and MCGUIRE, T.C. (1972):

Immunologically mediated glomerulitis of horse. I. Pathogenesis in persistent infection by EIA virus

Lab. invest. 26, 701-707

BARTA, O. and BARTA, V. (1978):

The equine complement system

Proc. 4 th Int. Conf. Equine Infect. Diseases IV, Chapter 20, 189-199

eds. Bryans, J.T. and Gerber, H., Princeton, NY, USA, Veterinary Publications

BARTÁ, O., BARTA, V. and WILLIAMS, E.J. (1973):

A method of titrating equine hemolytic complement

Z. Immun.-Forsch. 146, 114-122

BARTA, O. and HUBBERT, N.L. (1978):

Testing of hemolytic complement components in domestic animals

Amer. J. Vet. Res. 39, (8), 1303-1308

BRACHER, V. (1987):

Zur Erfassung der Dunkelziffer COPD-kranker Pferde

Diss. Zürich

BRENNER, L.J. (1971):

Non-reproducibility of total serum hemolytic complement assays

Z. Immun.-Forsch. 142, 205-220

CALDWELL, J.R., PEARCE, D.E., SPENCER, C., LEDER, R. and WALDMAN, R.H. (1973):

Immunologic mechanismus in hypersensitivity pneumonitis  
J. Allergy Clin. Immunol. 52, 225-230

CIBA (1959):

Terminology, definition and classification of chronic pulmonary emphysema and related conditions. A report of the conclusions of the CIBA guest symposium  
Thorax 14, 286-299

COCHRANE, C.G. and DIXON, F.J. (1978):

Immune complex injury  
M.Samter (Ed.) Immunological diseases 1, 210-229, Little, Brown Publishers, Boston, USA

COOK, W.R. and ROSSDATE, P.D. (1963):

The syndrome of "broken wind" in the horse  
Proc. Roy. Soc. Med. 56, 972-977

COOK, W.R. (1965):

The diagnosis of respiratory unsoundness in the horse  
Vet. Rec. 77, 516-528

CORBEIL, L.B. (1978):

Rate of the complement system in immunity and immunopathology  
Vet. Clin. N. Amer. 8, 585-611

DAMMANN-TAMKE, U. (1982):

Die chronisch obstruktive Bronchitis des Pferdes, eine Literaturstudie  
Diss. Hannover

EDWARDS, J.H. (1976):

A quantitative study on the activation of the alternative pathway of complement by mouldy hay dust and thermophytic actinomycetes

Clin. Allergy 6, 19-25

EGGENBERGER, E. und THUN, R. (1984):

Eine graphische Darstellung von Messwerten

Schweiz. Arch. Tierheilk. 126, 199-205

EHRlich, P. und SACHS, H. (1902):

Ueber den Mechanismus der Ambozeptorenwirkung

Berl. Klin. Wschr. 39, 492

EIKMEIER, H. (1977):

Zur chronischen Bronchitis des Pferdes

Tierärztl. Umsch. 32, 372-376

EYRE, P. (1972):

Equine pulmonary emphysema; a bronchopulmonary mould allergy

Vet. Rec. 91, 134-140

FRANK, M.M. (1979):

The complement system in host defense and inflammation

Rev. Infect. Dis. 1, (3), 483-501

GALAN, J.E. and TIMONEY, J.F. (1985):

Immun complexes in purpura hemorrhagica of the horse contain IgA and IgM antigen of streptococcus equi

J. Immunol. 135, 3134-3137

GERBER, H. (1973):

Chronic pulmonary disease in the horse

Equine Vet. J. 8, 26-33

GERBER, H. (1969):

Klinik und Therapie chronischer Lungenleiden des Pferdes

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 76, 234-239

GRANT, C.K. (1977):

Complement "specificity" and interchangeability: Measurement of hemolytic complement levels and use of the complement-fixation test with sera from common domesticated animals  
Amer. J. Vet. Res. 38, (10), 1611-1617

GRUENIG, G. (1984):

Zur Ätiologie und Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenkrankheiten (COPD) beim Pferd  
Diss. Zürich

GRUENIG, G., HERMANN, M., JORISCH, S. und von FELLEBERG, R. (1985):

Proteaseaktivität im Tracheobronchialsekret von Pferden mit COPD: Pathophysiologische Bedeutung  
Pferdeheilkunde 1, 1-72

HALL, L.W. and STARK, J.E. (1983):

COPD-or is it?  
Equine Vet. J. 15, 185-187

HALLIWELL, R.E.W., FLEISCHMANN, J.B., MACKAY-SMITH, M., BEECH, J. and GUNSON, D.E. (1979):

The rate of allergy in chronic pulmonary diseases of horses  
J. Amer. Vet. Med. Ass. 174, 277-281

HOCKENJOS, P., MUMCOUGLN, Y. und GERBER, H. (1981):

Zur möglichen ätiologischen Bedeutung von Heumilben für allergisch bedingte Lungenerkrankungen des Pferdes  
Schweiz. Arch. Tierheilk. 123, 129-136

KEW, R.R., GHEBREHIWET, B. and JANOFF, A. (1985):

Cigarette smoke can activate the alternative pathway of complement in vitro by modifying the third component of complement  
J. Clin. Invest. 5, 1000-1007

KREUTZER, D.L., McCORMICK, J.R., THRALL, R.S., HUPP, J.R.,  
MOORE, V.L. and FINK, J.N. (1982):

Elevation of serum chemotactic factor inactivator activity  
during acute inflammatory reactions in patients with  
hypersensitivity pneumonitis

Amer. Rev. Resp. Dis. 125, 612-614

KUNKEL, S.L., FANTONE, J.C. and WARD, P.A. (1981):

Complement mediated inflammatory reactions

Pathobiol. Annual 11, 127-154

KUTZ, S.A., MENTNECH, M.S., OLENCHOCK, S.A. and MAJOR, P.C.  
(1980):

Precipitation of serum proteins by extracts of cotton dust  
and stems

Environm. Res. 22, 476-484

LAWSON, G.H.K., McPHERSON, J.R., MURPHY, J.R., NICHOLSON,  
J.M., WOODING, P., BREEZE, R.P. and PIRIE, H.M. (1979):

The presence of precipitating antibodies in the sera of  
horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)

Equine Vet. J. 11, 172-176

LEVINE, L. (1978):

Micro-complement fixation

Handbook of experimental immunology

ed. by Weir, D.M., third edition, Blackwell scientific  
publications, Chapter 5 B

LINSCOTT, W.D. (1986):

Biochemistry and biology of the complement system in  
domestic animals

Prog. Vet. Microbiol. Immunol. 2, 54-77

LITTLEJOHN, A. (1979):

Chronic obstructive pulmonary disease in horses

Vet. Bull. 49, 907-917

- LUSKIN, A.T. and TOBIN, M.C. (1982):  
Alterations of complement components in disease  
Amer. J. Med. Technol. 48, 749-756
- McCALL, C.E. (1979):  
Complement (review article)  
Sth. Med. J. 72, (1), 47-52
- McDONALD, T.L. and BURGER, D. (1979):  
Purification of the subunit C1q from the first component of  
equine complement  
Immunology 37, 517-527
- McGUIRE, T.C., van HOOSIER jr., G.L. and HENSON, J.B. (1971):  
The complement-fixation reaction in equine infectious  
anemia: demonstration of inhibition by IgG(T)  
J. Immunol. 107, (6), 1738-1744
- McLAUGHIN, R.F., TYLER, W.S. and CANADA, R.O. (1961):  
A study of the subgross pulmonary anatomy in various animals  
J. Amer. Vet. Med. Ass. 175, 694-697
- McPHERSON, E.A. and LAWSON, G.H.K. (1974):  
Some aspects of chronic pulmonary diseases of horses and  
methods of their investigation  
Equine Vet. J. 6, 1-6
- McPHERSON, E.A., LAWSON, G.H.K., MURPHY, J.R., NICHOLSON,  
J.M., BREEZE, R.G. and PIRIE, H.M. (1979):  
COPD: Factors influencing the occurrence  
Equine Vet. J. 11, 167-171
- MUELLER-EBERHARD, H.J. (1978):  
Complement abnormalities in human disease  
Hosp. Pract. 65-76

MUNDIE, T.G., PILIA, P.A. und AINSWORTH, S.K. (1985):

Byssinosis: Serum immunoglobulin and complement concentration in cotton mill workers

Arch. Environm. Hlth. 40, 326-329

NAAMA, J.K., MITCHELL, W.S., ZOMA, A., VEITCH, J. and WHALEY, K. (1983):

Complement-mediated inhibition of immunprecipitation in patients with immun complex disease

Clin. Exp. Immunol. 51, 292-298

NAAMA, J.K., NIVEN, I.P., ZOMA, A., MITCHELL, W.S. and WHALEY, K. (1985):

Complement, antigen-antibody complexes and immun complex disease

J. Clin. Lab. Immunol. 17, 59-67

PAULI, B., GERBER, H. und SCHATZMANN, U. (1972):

"Farmer's lung" beim Pferd

Path. Et Microbiol. 38, 200-214

PERRYMAN, L.E., MCGUIRE, T.C., BANKS, K.L. and HENSON, J.B. (1971):

Decreased C3-levels in a chronic virus infection: equine infectious anemia

J. Immunol. 106, (4), 1074-1079

POWELL, R.J. (1984):

Serum complement levels

Brit. J. Hosp. Med. 32, 104/108-110

RICE, C.E. and BOULANGER, P. (1952):

The interchangeability of the complement components of different animal species

J. Immunol. 68, 197-205

ROBERTS, M.C. and KELLY, W.R. (1982):

Renal dysfunction in a case of purpura hemorrhagica in a horse

Vet. Rec. 110, 144

ROELCKE, D. und UHLENBRUCK, G. (1969):

Proteinase K: Eine neue, serologisch anwendbare Pilzspore

Z. Med. Mikrobiol. Immunol. 155, 156-170

RYNES, R.J., RUDDY, S., SCHUR, P.H., SPRAGG, J. and AUSTEN, K.F. (1974):

Levels of complement components, properdin factors and kininogen in patients with inflammatory arthritides

J. Rheum. 1, (4), 413-427

SASSE, H.H.L. (1971):

Some pulmonary function tests in horses. An aid to an early diagnosis in pulmonary diseases of chronic obstructive pulmonary diseases (heaves) in horses

Utrecht, Rijksuniversiteit, Proefschrift

SCHATZMANN, U. und GERBER, H. (1972):

Untersuchungen zur Aethiologie chronischer Lungenkrankheiten des Pferdes

Zbl. Vet. Med. A 19, 89-101

SCHATZMANN, U., STRAUB, R., GERBER, H., MEISTER, U. und SPOERRI, H. (1974):

Elimination von Heu und Stroh als Therapie chronischer Lungenerkrankungen beim Pferd

Tierärztl. Prax. 2, 207-214

SCHIFFERLI, J.A. and PETERS, D.K. (1983):

Complement, the immun-complex lattice and the pathophysiology of complement deficiency syndroms

Lancet 2, (8356), 957-959

SCHIFFERLI, J.A., STEIGER, G., HAUPTMANN, G., SPAETH, P.J. and SJOEHOLM, A.G. (1985):

Formation of soluble immun complexes by complement in sera of patients with various hypocomplementemic states

J. Clin. Invest. 76, 2127-2133

THEOFILOPOULOS, A.N. and DIXON, F.J. (1980):

Immun complexes in human diseases

Amer. J. Path. 100, 529-591

TRAUTWEIN, G. (1982):

Immunkomplexkrankheiten bei Mensch und Tieren (Rev. Article)

Zbl. Vet. Med. B 29, 165-185

TYLER, W.S., GILLESPIE, J.G. and NOWELL, J.A. (1971):

Symposium on pulmonary and cardiac function: I. Modern functional morphology of the equine lung

Equine Vet. J. 3, 84-94

VanDIJK, H., HEEZINS, E., VanKOOTEN, P.J.S., PIETERNEL, M., RADEMAKER, M., VanDAM, R. and WILLERS, J.M.N. (1983):

A study of the sensivity of erythrocytes to lysis by heterologous sera via the alternative complement pathway

Vet. Immunol. Immunopath. 4, 469-477

WENZEL, F.J., EMANUEL, D.A. and GRAY, R.L. (1971):

Immunfluoreszent studies in patients with farmer's lung

J. Allergy. Clin. Immunol. 48, 224-229

WILSON, R.W., SEKUL, A., ORY, R., SALVAGGIO, J.E. and LEHRER, S.B. (1980):

Activation of the alternative complement pathway by extracts of cotton plant

Clin. Allergy 10, 303-308

WINDER, C. and von FELLEBERG, R. (1986):

Immunfluorescent evaluation of the lower respiratory tract  
of healthy horses and of horses with chronic bronchitis

Amer. J. Vet. Res. 47, (6), 1271-1276

### Danksagung

Allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. R. v. Fellenberg für die Ueberlassung des Themas und das Referat.

Herrn PD Dr. H. Lutz für die Uebernahme des Korreferates, die Durchsicht des Manuskripts und die konstruktive Korrektur.

Frau Dr. G. Grünig für die wegbereitenden Vorarbeiten, die Einführung in die Labormethoden und die Durchsicht des Manuskripts.

Herrn und Frau Dr. A. und C. Brack-Brieger für die Schreibarbeiten.

Frau Dr. V. Bracher und Herrn Dr. M. Hermann für die zur Verfügung gestellten Seren.

Frau G. Hägeli und Frau K. Zlinsky für die aufmunternde Anteilnahme an meiner Arbeit.

Herrn P. Gantenbein für die graphische Darstellung der Abb. 1.

Die Arbeit wurde durch den schweizerischen Nationalfonds unterstützt.

## Lebenslauf

Lerch-Leemann, Cynthia Margret, von Murgenthal und Meilen,  
geboren 1956, verheiratet und Mutter eines Kindes.

1964-1976 Primar-, Bezirks- und Kantonsschule (mathematisch-  
naturwissenschaftliches Gymnasium) in Baden

1976-1981 Studium an der Veterinärmedizinischen Fakultät in  
Zürich

1982-1985 Assistentin in der Gross- und Kleintierpraxis bei  
Dr. W. Willi in Baden

1986 Assistentin am Institut für Veterinärphysiologie in  
Zürich (Leiter: Prof. Dr. E. Scharrer)

seit 1987 Teilzeitassistentin in der Kleintierpraxis bei Dr.  
H. Eisenegger in Bülach



